

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Brigitte BATHE, et al.

GAU:

SERIAL NO: New Application

EXAMINER:

FILED: Herewith

FOR: PROCESS FOR THE PRODUCTION OF L-LYSINE USING CORYNEFORM BACTERIA

REQUEST FOR PRIORITY

COMMISSIONER FOR PATENTS
ALEXANDRIA, VIRGINIA 22313

SIR:

- Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- Full benefit of the filing date(s) of U.S. Provisional Application(s) is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
Application No. Date Filed
60/401,751 August 8, 2002
- Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
Germany	102 35 028.0	July 31, 2002

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- are submitted herewith
- will be submitted prior to payment of the Final Fee
- were filed in prior application Serial No. filed
- were submitted to the International Bureau in PCT Application Number
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
- (B) Application Serial No.(s)
 are submitted herewith
 will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, PC

Jean-Paul Lavallee

Registration No. 31,451



22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 05/03)

Thomas W. Barnes III, Ph.D.
Registration No. 52,595

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 35 028.0
Anmeldetag: 31. Juli 2002
Anmelder/Inhaber: Degussa AG,
Düsseldorf/DE
Bezeichnung: Verfahren zur Herstellung von L-Lysin unter
Verwendung coryneformer Bakterien
IPC: C 12 P, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 20. Juni 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Wehner

**V erfahren zur Herstellung von L-Lysin unter Verwendung
coryneformer Bakterien**

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von L-Lysin, unter Verwendung coryneformer Bakterien, die 5 resistent gegen Diaminopimelinsäure-Analoga, insbesondere 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure, sind.

Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der 10 Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt, dass Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum hergestellt werden. Wegen der 15 großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie zum Beispiel die 20 Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

25 Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie zum Beispiel das Lysin-Analogon S-(2-Aminoethyl)-Cystein oder auxotroph 30 für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und L-Aminosäuren produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung L-

Aminosäure produzierender Stämme von *Corynebacterium glutamicum* eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die L-Aminosäure-Produktion untersucht.

5 Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich die Aufgabe gestellt, neue Grundlagen für verbesserte Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Lysin, mit coryneformen Bakterien bereitzustellen.

10 Beschreibung der Erfindung

Wenn im Folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt werden, sind damit nicht nur die Basen, sondern sind auch die Salze wie z.B. Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur
15 fermentativen Herstellung von L-Lysin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die resistent gegen Diaminopimelinsäure-Analoga, insbesondere 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure, sind.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls ein Verfahren zur
20 fermentativen Herstellung von L-Lysin, unter Verwendung von bereits L-Lysin produzierenden coryneformen Bakterien, die resistent gegen Diaminopimelinsäure-Analoga, insbesondere 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure, sind.

Gegenstand dieser Erfindung ist weiterhin ein Verfahren zur
25 Herstellung von L-Lysin in dem folgende Schritte durchführt werden:

- a) Fermentation der L-Lysin produzierenden coryneformen Bakterien, die zumindest resistent gegen Diaminopimelinsäure-Analoga, insbesondere 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure, sind;

- b) Anreicherung des L-Lysin im Medium oder in den Zellen der Bakterien; und
- c) Isolierung des L-Lysin oder L-Lysin enthaltenden Futtermitteladditivs aus der Fermentationsbrühe,
5 gegebenenfalls
- d) mit Bestandteilen aus der Fermentationsbrühe und/oder der Biomasse (> 0 bis 100 %).

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls ein Verfahren zur Herstellung coryneformen Bakterien, die resistent gegen

10 Diaminopimelinsäure-Analoga, insbesondere 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure, sind.

Die eingesetzten Stämme produzieren bevorzugt bereits vor der Resistenz gegen 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure L-Lysin.

Unter dem Begriff Diaminopimelinsäure-Analoga werden nach

15 der vorliegenden Erfindung Verbindungen wie

- 4-Fluoro-Diaminopimelinsäure,
- 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure,
- 4-Oxo-Diaminopimelinsäure oder
- 2,4,6-Triaminopimelinsäure

20 zusammengefasst.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Laktose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um

25 Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung Corynebacterium handeln. Bei der Gattung Corynebacterium ist insbesondere die Art Corynebacterium glutamicum zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum*, sind besonders die bekannten Wildtypstämme

- 5 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032
 Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806
 Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870
 Corynebacterium melassecola ATCC17965
 Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539
 Brevibacterium flavum ATCC14067
10 *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 und
 Brevibacterium divaricatum ATCC14020

und daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende Mutanten bzw. Stämme

wie beispielsweise die L-Lysin produzierenden Stämme

- 15 *Corynebacterium glutamicum* FERM-P 1709
 Brevibacterium flavum FERM-P 1708
 Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712
 Corynebacterium glutamicum FERM-P 6463
 Corynebacterium glutamicum FERM-P 6464
20 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21513
 Corynebacterium glutamicum ATCC 21544
 Corynebacterium glutamicum ATCC 21543
 Corynebacterium glutamicum DSM 4697 und
 Corynebacterium glutamicum DSM 5715.
- 25 Es wurde gefunden, dass coryneforme Bakterien, die resistent gegen Diaminopimelinsäure-Analoga, insbesondere 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure, sind in verbesserter Weise L-Lysin produzieren.
- 30 Zur Erzeugung der erfindungsgemäßen gegen 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure resistenten coryneformen Bakterien, werden im Stand der Technik beschriebene Mutagenesemethoden verwendet.

Für die Mutagenese können klassische in-vivo Mutageneseverfahren unter Verwendung mutagener Stoffe wie beispielsweise N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin oder ultraviolette Licht (Miller, J. H.: A Short Course in

- 5 Bacterial Genetics. A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1992) verwendet werden.

Die coryneformen Bakterien, die resistent gegenüber 4-

- 10 Hydroxy-Diaminopimelinsäure sind, können durch Ausplatieren auf 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure haltigen Nährmediumsplatten identifiziert werden. Hierzu eignen sich in besonderem Maße Endkonzentrationen von 10g/l 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure im Nährmedium. Bei dieser Konzentration 15 können 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure resistente Mutanten von den unveränderten Elternstämmen durch ein verlangsamtes Wachstum unterschieden werden. Nach erfolgter Selektion zeigen die 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure resistente Mutanten eine verbesserte L-Lysinproduktion.

- 20 Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Lysin vorteilhaft sein, zusätzlich zur Resistenz gegen 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus, des Pentosephosphatzzyklus, des Aminosäure-Exports und gegebenenfalls regulatorische Proteine zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren. Die Verwendung endogener Gene wird im allgemeinen bevorzugt.

- 25 Unter „endogenen Genen“ oder „endogenen Nukleotidsequenzen“ versteht man die in der Population einer Art vorhandenen Gene beziehungsweise Nukleotidsequenzen.

Der Begriff „Verstärkung“ bzw. „Verstärken“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme bzw. Proteine in einem

Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor oder ein Gen oder Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym bzw.

- 5 Protein mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Durch die Maßnahmen der Verstärkung, insbesondere Überexpression, wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins im allgemeinen um mindestens 10%,

- 10 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% oder 500%, maximal bis 1000% oder 2000% bezogen auf die des Wildtyp-Proteins beziehungsweise der Aktivität oder Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus erhöht.

- 15 So kann für die Herstellung von L-Lysin zusätzlich zur Resistenz gegen 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure eines oder mehrere der Gene ausgewählt aus der Gruppe:

- das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (Accession No.P26512, EP-B-0387527; EP-A-0699759; WO 00/63388),
- 20 • das für die Dihydridipicolinat-Synthase kodierende Gen dapA (EP-B 0 197 335),
- das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen gap (Eikmanns (1992). Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- 25 • gleichzeitig das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc (DE-A-198 31 609, EP-A-1108790),
- das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen zwf (JP-A-09224661, EP-A-1108790),
- 30 • gleichzeitig das für den Lysin-Export-Protein kodierende Gen lysE (DE-A-195 48 222),

- das für das Zwal-Protein kodierende Gen zwal (DE: 19959328.0, DSM 13115),
 - das für die Diaminopimelinsäure Decarboxylase kodierende Gen lysA (Accession Nr. X07563),
- 5 • das für den Sigma-Faktor C kodierende Gen sigC (DE: 10043332.4, DSM14375),
- das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen tpi (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086) und
- 10 • das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen pgk (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086), verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Lysin, vorteilhaft sein, zusätzlich zur Resistenz gegen 4-Hydroxy-
15 Diaminopimelinsäure gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck (DE 199 50 409.1, DSM 13047),
 - das für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase kodierende Gen pgi (US 09/396,478, DSM 12969),
 - das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB (DE:1995 1975.7, DSM 13114),
 - das für die DNA-Helikase kodierende Gen deaD (DE: 10047865.4, DSM14464),
- 25 • das für die Citrat Lysase kodierende Gen citE (PCT/EP01/00797, DSM13981),
- das für die O-Succinylbenzoësäure-CoA-Ligase kodierende Gen menE (DE: 10046624.9, DSM14080),

das für den Transkriptionsregulator MikE17 kodierende Gen mikE17 (DE: 10047867.0, DSM14143) und

- das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2 (DE: 19959327.2, DSM 13113)

5 abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die 10 entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Gen oder Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese 15 Maßnahmen kombiniert.

Durch die Maßnahmen der Abschwächung wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins im allgemeinen auf 0 bis 75%, 0 bis 50%, 0 bis 25%, 0 bis 10% oder 0 bis 5% der Aktivität oder Konzentration des Wildtyp- 20 Proteins, beziehungsweise der Aktivität oder Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus, herabgesenkt.

Schließlich kann es für die Produktion von L-Lysin, vorteilhaft sein, neben der Resistenz gegen 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure unerwünschte Nebenreaktionen

25 auszuschalten (Nakayama: „Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms“, in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind 30 ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren)

zum Zwecke der Produktion von L-Lysin kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag,

- 5 Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muss in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen.

- 10 Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology“, der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Laktose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure,

Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische

- 20 Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt,

Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff

- 25 oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure,

- 30 Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muss weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können

essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur 5 Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw.

10 Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem 15 Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff-haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise 20 bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

25 Methoden zur Bestimmung von L-Lysin sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch 30 reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von L-Lysin.

Die Konzentration von L-Lysin kann gegebenenfalls durch den Zusatz von L-Lysin auf den gewünschten Wert eingestellt werden.

- Durch die beschriebenen Verfahren gelingt es coryneforme
5 Bakterien zu isolieren, die resistent gegen
Diaminopimelinsäure-Analoga, insbesondere 4-Hydroxy-
Diaminopimelinsäure, sind, und nach den beschriebenen
Fermentationsverfahren in verbesserter Weise L-Lysin
produzieren.

Patentsprüche

1. Verfahren zur Herstellung von L-Lysin, dadurch gekennzeichnet, dass man folgende Schritte durchführt,

- 5 a) Fermentation der L-Lysin produzierenden coryneformen Bakterien, die zumindest resistent gegen Diaminopimelinsäure-Analoga, insbesondere 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure, sind;
- 10 b) Anreicherung des L-Lysin im Medium oder in den Zellen der Bakterien; und
- c) Isolierung des L-Lysin oder L-Lysin enthaltenden Futtermitteladditivs aus der Fermentationsbrühe, gegebenenfalls
- 15 d) mit Bestandteilen aus der Fermentationsbrühe und/oder der Biomasse (> 0 bis 100 %).

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges des L-Lysin verstärkt.

- 20 3. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung des L-Lysin verringern.

- 25 4. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man für die Herstellung von L-Lysin coryneforme Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 30 4.1 das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC,

- 4.2 das für die Dihydripicolinat-Synthase kodierende Gen dapA,
- 4.3 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen gap,
- 5 4.4 das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc,
- 4.5 das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen zwf,
- 10 4.6 gleichzeitig das für den Lysin-Export-Proteins kodierende Gen lysE,
- 4.7 das für das Zwal-Protein kodierende Gen zwal,
- 4.8 das für die Diaminopimelinsäure Decarboxylase kodierende Gen lysA,
- 4.9 das für den Sigma-Faktor C kodierende Gen sigC,
- 15 4.10 das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen tpi, oder
- 4.11 das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen pgk,
- verstärkt, insbesondere überexprimiert.
- 20 5. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Herstellung von L-Lysin coryneforme Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 25 5.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende pck-Gen,
- 5.2 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende pgi-Gen,

- 5.3 das für die DNA-Helikase kodierende Gen deaD,
 - 5.4 das für die Citrat Lysase kodierende Gen citE,
 - 5.5 das für die O-Succinylbenzoësäure-CoA-Ligase kodierende Gen meine,
 - 5 5.6 das für den Transkriptionsregulator MikE17 kodierende Gen mikE17,
 - 5.7 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB, oder
 - 5.8 das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2,
- 10 abschwächt.
- 6. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man Mikroorganismen der Art Corynebacterium glutamicum einsetzt.
 - 15 7. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man Mikroorganismen der Art Corynebacterium glutamicum einsetzt, die resistent gegen 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure sind.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von L-Lysin, bei dem man folgende Schritte durchführt:

- a) Fermentation der L-Lysin produzierenden coryneformen
5 Bakterien, die zumindest resistent gegen Diaminopimelinsäure-Analoga, insbesondere 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure, sind;
 - b) Anreicherung des L-Lysin im Medium oder in den Zellen der Bakterien; und
 - 10 c) Isolierung des L-Lysin oder L-Lysin enthaltenden Futtermitteladditivs aus der Fermentationsbrühe, gegebenenfalls
 - d) mit Bestandteilen aus der Fermentationsbrühe und/oder der Biomasse (> 0 bis 100 %).
- 15 und gegebenenfalls Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges des L-Lysin verstärkt, oder Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung des L-Lysin verringern.